с культурой клеток, в которых осуществляли трансфекцию с помощью микрогранул, развитие цитопатического действия (ЦПД), характерного для ВБА, обнаруживали уже на 2-е сутки, в то время как в других образцах появление ЦПД не наблюдали. На 4-е сутки ЦПД было обнаружено в культуре клеток, трансфекцию в которых осуществляли с использованием липофектамина. На культуре клеток с ДЕАЕ-декстраном ЦПД не наблюдали в течение 6 дней (срок наблюдения). Полученный цитопатический эффект был обусловлен вирусом болезни Ауески, что подтверждено также методом ПЦР со специфическими праймерами к gp 50, размер ПЦР-продукта составлял 492 п.о.

Таким образом, разработан метод микрокапсулирования ДНК, состоящий из следующих этапов: 1) сорбция ДНК пористыми микрочастицами $CaCO_3$ при 4° С 20-24 часа; 2) нанесение полимерных слоев Alg- PLL-Alg- PLL-Alg- PLL; 3) растворение внутреннего ядра $CaCO_3$; 4)отмывание микрокапсул с заключенной в них ДНК.

Выводы

Проведенные исследования показали, что разработанный метод микрокапсулирования ДНК путем послойной адсорбции противоположно заряженных биодеградируемых полиэлектролитов на сферические макропористые микрочастицы $CaCO_3$ может быть использован для доставки генетического материала (нуклеиновой кислоты) в эукариотические клетки in vivo и in vitro. Разработанный метод микрокапсулирования может быть использован при конструировании ДНК-вакцин.

Работа выполнена по проекту РФФИ 06-04-08-277

РЕЗЮМЕ

Работа относится к области нанотехнологий и технологиям соматической генной терапии. Представлены результаты получения микрокапсул с регулируемыми параметрами (диаметр, толщина оболочки, состав и проницаемость мембраны) и иммобилизации в них ДНК вируса болезни Ауески. Микрокапсулирование ДНК может быть использовано как способ доставки ДНК-вакцин.

SUMMARY

The area of nanotechnologies and somatic gene therapy technologies is considered. The paper demonstrates results of generation of microcapsules having regulated properties (diameter, capsule thickness, membrane composition and permeability) and the results of Aujeszky's disease viral DNA immobilization in these microcapsules. The DNA microcapsulation can be used for DNA-vaccine delivery.

Литература

1. Микрокапсулирование ДНК как способ доставки ДНК вакцин /В.И. Балышева, Н.Н.Власова, О.Е. Селина, [и др.] // Росс. вет. журн. Мелкие домашние и дикие животные. 2007. №1. С. 25-26.
2. Combined DNA vaccine encapsulated in microspheres enhanced protection efficacy against Mycobacterium tuberculosis infection of mice /H. Cai, X.D. Hu, D.H. Hu, [et al.] //Vaccine.2005. Vol. 23. P. 4167-4174.
3. Clark, J.R. Bacterialvirusis as human vaccinsFuture drugs /J.R. Clark, J.B. March //Expert Rev. Vaccines. 2004. Vol. 3,4. P. 463-476
4. Johnson M. E., Mossman S., Cecil T., Evans L. Patent No.:US 2002/0032165 A1 Mar.14, 2002.

УДК 619:619.98:579.842.14

И.А. Степанова, О.В. Бородина, Ф.А. Ширяев

ПЕРСИСТЕНЦИЯ САЛЬМОНЕЛЛ В ОРГАНИЗМЕ ВАКЦИНИРОВАННЫХ ЖИВОТНЫХ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ

Введение

Сальмонеллез – инфекционное контагиозное заболевание многих видов домашних, диких животных и птиц, широко распространенное среди сельскохозяйственных животных, наносящее большой ущерб животноводству и представляющее угрозу здоровью людей [1, 6].

Возбудители сальмонеллеза могут вызывать как первичные инфекции (брюшной тиф человека, сальмонеллезы молодняка животных, пуллороз птиц), так и вторичные, осложняющие бактериальные и вирусные болезни (пневмонии молодняка, чума свиней). У людей они вызывают пищевые токсикоинфекции при употреблении инфицированных продуктов животного происхождения [2, 3].

Домашняя птица, свиньи, крупный рогатый скот являются основным резервуаром инфекции, а продукты питания животного происхождения – источником зараже-

ния людей. Одной из причин такого положения является способность сальмонелл длительное время персистировать в организме животных (сальмонеллоносительство), а при выделении во внешнюю среду длительно (до года) сохраняться в навозе и контаминированных предметах [1].

Широкое применение противосальмонеллезных вакцин в свиноводстве значительно снизило за последние годы количество случаев тифозной формы течения сальмонеллеза. Однако наличие энтероколитов и выделение сальмонелл из патматериала от вакцинированных животных иногда воспринимается как неудовлетворительное качество вакцин [6].

Считается, что вакцинация предотвращает или снижает клинически выраженный сальмонеллез и малоэффективна против субклинических форм заболевания и сальмонеллоносительства [4, 5]. Поэтому целью работы было определение выживания сальмонелл в крови свиней, иммунизированных инактивированной вакциной, а также возможного выделения бактерий с фекалиями после экспериментального внутрибрюшинного заражения.

Материалы и методы

Эксперименты проводили на поросятах 4-недельного возраста. Всего использовано 20 животных, 16 из которых иммунизировали вакциной против сальмонеллеза свиней инактивированной эмульсионной производства ФГУ «ВНИИЗЖ» (ТУ 9884-093-00495527-02), а 4 невакцинированных служили в качестве контроля. Вакцину разводили с трехкратным шагом в плацебо и вводили поросятам однократно внутримышечно по 0,5 см^3, используя по 4 животных на разведение.

Через 21 день после иммунизации поросят заражали суспензией 18-часовой агаровой культуры *Salmonella choleraesuis* штамма №370. Заражение проводили внутрибрюшинно в дозе 40 млрд микробных клеток (м.к.) на животное.

За животными вели наблюдение в течение 10 дней с момента заражения. До и после экспериментального заражения у поросят ежедневно измеряли температуру тела. Для бактериологического анализа брали пробы крови (метод гемокультуры) и кала (метод копрокультуры), а также получали сыворотку крови для определения уровня противосальмонеллезных антител через 2, 4, 6, 8 и 10 суток. Уровень противосальмонеллезных антител определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) и в реакции агглютинации (РА). По истечении срока наблюдения провели вынужденный убой всех животных с последующим бактериологическим анализом отобранного от них патологического материала.

Прижизненному бактериологическому исследованию подвергали кровь и кал экспериментально зараженных поросят. Кровь у животных брали из ушной вены, прокалывая ее стерильной иглой. Сразу после взятия кровь высевали в 6-7 пробирок на МПА и МПБ. После 20-24-часового выращивания делали пересев на среду Эндо в чашки Петри. Дальнейшие бактериологические исследования проводили по общепринятой методике.

Для выделения копрокультур от зараженных поросят в стерильные пробирки брали небольшое количество кала (2-3 г), разводили физиологическим раствором и после оседания грубых частиц делали посев на среды накопления – среду Мюллера и желчный МПБ. Через сутки делали дробный пересев на скошенный МПА в пробирках. Выделенные чистые культуры сальмонелл испытывали со специфическими монорецепторными сыворотками.

Результаты и обсуждение

Проведенные исследования показали, что первые трое суток после экспериментального заражения у невакцинированных поросят контрольной группы наблюдалось повышение температуры тела до 41,3° С (при норме 38,0-40,0° С), рвота, отказ от корма. На четвертые сутки одно животное пало. На 5-6 сутки состояние здоровья поросят нормализовалось. Температура тела снизилась до 39,8-40,8° С, но в течение всего срока наблюдения у животных наблюдали угнетенное состояние и плохое поедание корма.

Для прижизненного бактериологического анализа от животных брали пробы крови и кала. От павшего животного бактериологическому анализу подвергали пробы внутренних органов (селезенка, печень, мезентериальные лимфоузлы и др.). Из крови, кала и исследуемых органов был выделен штамм *S. choleraesuis*, использованный для заражения. Концентрация сальмонелл в кале к 6-м суткам достигала 100 000 м.к./г (4,5–5,0 lgKOE/г).

После контрольного заражения вакцинированных поросят у трех подсвинков (разведение вакцины 1:27) было кратковременное повышение температуры тела до 40,5° С. У остальных животных, как и ожидалось, клинических признаков заболевания выявлено не было.

Результаты бактериологического ана-

Таблица 1

Выделение сальмонелл из крови экспериментально зараженных свиней

№	Разведение вакцины	Обнаружение сальмонелл, дни									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2		-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
3		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4		-	-	-	+	-	+	+	-	+	-
5	1:3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7		-	+	+	-	+	-	-	-	+	-
8		-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
9	1:9	-	-	-	-	-	-	-	-		-
10		-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
11		-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
12		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	1:27	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
14		-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
15		-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
16		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	Невакцинированные	+	+	+	пал						
18		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
19		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

«+» - наличие признака;
«-» - отсутствие признака

Таблица 2

Выделение сальмонелл из кала экспериментально зараженных свиней

№	Разведение вакцины	Обнаружение сальмонелл, дни									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2		-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
3		-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
4		-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
5	1:3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6		-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
7		-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
8		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	1:9	-	-	-	-	-	-	-	-		-
10		-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
11		-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
12		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	1:27	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
14		-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
15		-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
16		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	Невакцинированные	-	-	+	пал						
18		-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
19		-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
20		-	-	+	+	+	+	+	+	+	+

«+» - наличие признака;
«-» - отсутствие признака

лиза проб крови (табл. 1) и кала (табл. 2) от вакцинированных свиней, оставшихся клинически здоровыми после заражения, свидетельствуют, что возбудитель сальмонеллеза обнаруживался в крови животных уже на второй день после заражения, а начиная с 4-х суток жизнеспособные сальмонеллы можно было выделить из кала.

После убоя животных *S. choleraesuis* выделили из тканей печени, селезенки, легкого, содержимого тонкого отдела кишечника, мезентериальных лимфоузлов и желчи тех поросят, у которых возбудитель выделяли при жизни из крови.

Результаты исследования сывороток крови свиней показали (табл. 3), что уровень противосальмонеллезных антител после вакцинации у них был низкий как

Таблица 3

Уровень противосальмонеллезных антител

№ животного	Разведение вакцины	Уровень антител через 21 день после вакцинации		Уровень антител на 10-й день после заражения	
		ИФА	РА	ИФА	РА
1	0	17801	501	2500	200
2		1540	100	2600	100
3		1780	100	2960	200
4		560	50	1780	100
M±m2		1415±290	75±14	2460±247	150±28
5	1:3	560	50	1900	200
6		1900	100	2440	800
7		1440	50	3460	400
8		1780	100	2500	200
M±m		1420±302	75±14	2575±324	400±141
9	1:9	480	50	1980	200
10		1090	100	2600	200
11		2930	100	3380	400
12		1460	200	3850	400
M±m		1490±520	112±31	2952±414	300±57
13	1:27	1360	100	2930	800
14		1090	50	2440	200
15		1590	200	3930	400
16		440	50	1780	200
M±m		1120±248	100±35	2770±452	400±141
17	Невакцинированные	560	<25	пал	
18		140	25	2550	400
19		460	50	3100	400
20		170	<25	2500	200
M±m		332±104	31±6	2716±191	333±66

1- титр активности сыворотки;

2- средняя величина ± средняя ошибка для средней величины

на соматический в РА, так и на жгутиковый антиген в ИФА. При этом четкой зависимости уровня антител от дозы антигена не наблюдали. После контрольного заражения уровень специфических антител повысился в среднем у вакцинированных животных в 2 раза, у невакцинированных – в 8-10 раз.

Важно отметить, что иммунизация поросят инактивированной вакциной против сальмонеллеза хотя и защищает животных от клинически выраженной формы заболевания (тифоидной), однако не предотвращает диссеминацию сальмонелл и выделение возбудителя с фекалиями. Возможно, это обусловлено способностью сальмонелл сохраняться и размножаться в фагоцитах. Бактерии, циркулируя в крови животных, попадают в желчный пузырь, откуда с желчью выделяются в просвет кишечника, а затем с фекалиями во внешнюю среду.

Выводы

1. Инактивированная вакцина против сальмонеллеза свиней обеспечивает защиту иммунизированных животных от заболевания, но не исключает персистенцию сальмонелл в организме и выделение возбудителя с экскрементами во внешнюю среду.

2. Не выявлена зависимость между защитой и уровнем противосальмонеллезных антител в крови вакцинированных животных.

РЕЗЮМЕ

В статье представлены результаты исследования выживаемости сальмонелл в организме вакцинированных свиней. Установлено, что после контрольного заражения в крови вакцинированных животных определенное время могут присутствовать жизнеспособные сальмонеллы. Показано, что иммунизация поросят инактивированной вакциной против сальмонеллеза защищает животных от заболевания, но не исключает сальмонеллоносительство и выделение возбудителя во внешнюю среду.

SUMMARY

The paper presents the study results of salmonella persistence in organisms of vaccinated pigs. It is demonstrated that after the challenge vaccinated animals are protected against salmonellosis but they remain salmonella-carriers and shed salmonella with faeces. Viable salmonella can be present in blood of vaccinated animals for a certain period of time.

Литература

1. Ахмедов, А.М. Сальмонеллезы молодняка / А.М. Ахмедов. 2-е изд., испр. и доп. М.: Колос, 1983. 256 с.
2. Матвиенко, Б.А. Сальмонеллезы животных – биологическая и ветеринарная проблема / Б.А. Матвиенко // Эпизоотол., эпидемиол., средства диагностики, терапии и специфич. профилактики инфекц. болезней, общих для человека и животных: матер. Всесоюз. конф. Львов, 1988. С. 293-294.
3. Anderson, M. The clinical syndromes caused by Salmonella infections / M. Anderson, P. Blanchard // Vet. Med. 1989. Vol.4, №8. P. 816-819
4. Collins, F. M. Infection – immunity in experimental Salmonellosis / F. Collins, G.B. Mackaness // J. Exp. Med.- 1966.- №124.-P. 601-619.
5. Osawa, N. Experimental salmonellosis. Postinfective immunity and its significance for conferring cellular immunity / N. Osawa / / J. Bacteriol. 1967. Vol.93. P. 1534-1540.
6. Walton, J. R. Salmonellosis / J. R. Walton // Brit. Vet. J. 1983. Vol. 139, №3. P. 185-191.

УДК 619:616.98:579.843.96.

А.А. Фроловцева, В.С. Русалеев, А.В. Потехин

СЕРОТИПИРОВАНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЯ АКТИНОБАЦИЛЛЕЗНОЙ ПЛЕВРОПНЕВМОНИИ СВИНЕЙ

Введение

Актинобациллезная плевропневмония свиней – инфекционное контагиозное заболевание свиней, характеризующееся септикотоксемией, геморрагической и гнойно-некротизирующей пневмонией, а также серозно-фибринозным плевритом, перикардитом и артритами. Заболевание вызывают бактерии *A. pleuropneumoniae* семейства *Pasteurellaceae*.

Штаммы *A. pleuropneumoniae* разделяют на 15 серовариантов по капсульному антигену (1, 8). Известно, что сероспецифические антигены бактерий A. pleuropneumoniae локализованы в капсульных полисахаридах и О-полисахаридных компонентах (О-цепях) липополисахаридов (8).

Для определения сероварилнтной принадлежности бактерий *A. pleuropneumoniae* используют ряд серологических реакций – реакция агглютинации, реакция иммуноэлектрофореза, реакция непрямой гемагглютинации, реакция преципитации и иммуноферментный анализ с моноклональными антителами [2, 3, 4, 5].

Изучение сероварилнтного разнообразия изолятов возбудителя актинобациллезной плевропневмонии свиней, циркулирующих на территории Российской Федерации, позволит более объективно оценивать эпизоотологию данного заболевания и отбирать наиболее перспективные штаммы для совершенствования и разработки препаратов для специфической профилактики.

Целью данной работы было изучение сероварилнтной принадлежности изолятов *Actinobacillus pleuropneumoniae*, выделенных из патологического материала от свиней в различных регионах Российской Федерации.

Материалы и методы

В работе использовали изоляты *A. pleuropneumoniae* «Ш-1», «К-2» и «К-1», выделенные из патологического материала в лаборатории микробиологии ФГУ «ВНИИЗЖ», и референтные штаммы *A. pleuropneumoniae* №№ 27088 (1 серотип), 27089 (2 серотип), 27090 (3 серотип), 33377 (5 серотип), 33590 (6 серотип), полученные из Американской коллекции типовых культур.

Получение антигенов. Для получения антигенов использовали 12-15-часовые агаровые культуры изолятов и штаммов *A. pleuropneumoniae*.

Капсульный антиген для реакции преципитации (РП), реакции непрямой гемагглютинации (РНГА) получали по методикам, описанным R. Nielsen, P.J. O'Connor [6] и R. Nielsen et al. [7].

Соматический антиген для реакции агглютинации (РА) получали по методике A. Gunnarsson et al. [2].

Получение гипериммунных сывороток. Гипериммунные сыворотки крови кроликов готовили по методике R. Nielsen et al. [7].

Реакцию преципитации (РП) в агаровом геле, реакцию агглютинации (РА) и реакцию непрямой гемагглютинации (РНГА) для определения сероварилнтной принадлежности изолятов A. pleuropneumoniae проводили по традици-